

РЕГЕНЕРАТОРНІ БІОМЕДИЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ У ВИГЛЯДІ ВВЕДЕННЯ АУТОЛОГІЧНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПРИ ТРАВМАТИЧНИХ УШКОДЖЕННЯХ СУГЛОБОВОГО ХРЯЩА

Коструб О.О., Поляченко Ю.В., Котюк В.В., Блонський Р.І., Засаднюк І.А., Подік В.А.

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» Київ, Україна

Вступ. Проблема відновлення пошкодженого суглобового хряща в сучасній ортопедії залишається актуальною. При використанні артроскопічного методу обстеження ушкодження суглобового хряща виявляється у 63 – 92 % усіх внутрішньосуглобових травм колінного суглоба.

Складна організація позаклітинного матриксу, як і відсутність інервації, кровопостачання та лімфатичного дренажу суглобового хряща перешкоджають хондроцитам мігрувати до ділянки ушкодження, що зумовлює слабку репаративну реакцію в зоні дефекту. Потенціал хондроцитів, щодо загоювання ушкоджень суглобового хряща обмежений. Певну роль у загоюванні часткових дефектів суглобового хряща відіграють мезенхімальні стовбурові клітини, які можуть переміщуватися із синовіального шару суглобової капсули в ділянку ушкодження та брати участь у процесах хондрорепарації, а при глибоких ушкодженнях, що проникають в субкортикальний шар, і за рахунок мігруючих із субхондріального простору мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку, які можуть розмножуватися та диференціюватися в хондроцити. Але через складні міжклітинні взаємодії та відсутність оптимальних умов регенерат частіше набуває характеру сполучної тканини чи волокнистого хряща.

Консервативні методи лікування ушкоджень СХ, існуючі на сьогоднішній день, спрямовані на зменшення больового синдрому, усунення запалення, оптимізацію обміну в хрящовій тканині, відновлення фізико-хімічного складу синовіальної рідини, однак дія їх малоєфективна щодо регенерації хряща. Останнім часом у світі для відновлення суглобового хряща і усунення його дефекту все більшої популярності набувають методи клітинної та тканинної імплантації. Найбільш розповсюдженою та дослідженою є методика трансплантації аутологічних хондроцитів. Однак, доведено, що при оцінці більш віддалених результатів ця методика не має переваг перед іншими артропластичними втручаннями. Більш перспективним матеріалом для відновлення суглобового хряща вважаються мезенхімальні стовбурові клітини пацієнта, які можна отримувати із спонгіозної кісткової тканини. Однак, потенційні можливості стовбурових мезенхімальних клітин у регенерації суглобового хряща, ступінь їх безпечності та ефективність потребують подальших досліджень.

Мета дослідження: Вивчити вплив аутологічних мезенхімальних клітин кісткового мозку на регенерацію суглобового хряща при його травматичному пошкодженні.

Матеріал та методи. Вивчали вплив культури аутологічних мезенхімальних суглобових клітин кісткового мозку на розвиток дегенеративно-дистрофічного процесу в суглобовому хрящі кролів. Кролів розділили на три серії. Перша серія (контрольна група) – кролі, яким внутрішньосуглобово вводили сольовий фізіологічний розчин. Друга серія – тварини, яким вводили культуру недиференційованих аутологічних МСК кісткового мозку. Третя серія – тварини, яким вводили культуру недиференційованих аутологічних МСК кісткового мозку;

Джерелом мезенхімальних суглобових клітин був кістковий мозок, який отримували механічним шляхом з крила клубової кістки кролика. Однак нерідко при культивуванні в стандартних умовах ці клітини втрачають свою проліферативну здатність. Раніше було помічено, що клітини проліферують швидше та максимально зберігають мультипотентність, якщо вони проходять через посів із низькою щільністю. Таким чином, за результатами проведених досліджень нами була вибрана первинна щільність посіву 50 клітин/см², як оптимальна для нарощування маси клітин, а найкращий хондрогенний

потенціал виявлено в культурі із семиденною попередньою інкубацією у стандартному середовищі з наступним хондрогенним диференціюванням. Хондрогенне диференціювання культури аутологічних мезенхімальних суглобових клітин кісткового мозку доведено за наявністю в екстрацелюлярному матриксі агрегатів клітин протеогліканів та колагену II типу.

У наших дослідах використовували недиференційовані аутологічні мезенхімальні суглобові клітини кісткового мозку, а також предиференційовані мезенхімальні суглобові клітини на стадії максимального хондрогенного потенціалу.

Якість репаративних процесів у місці дефекту оцінювали враховуючи поверхневу будову регенерату, морфологію новоутвореної тканини, структури її матриксу, характер та життєздатність хондроцитів, стан кальцифікованої зони хряща та підхрящової кісткової пластинки, наявність зон вторинної осифікації та кровоносних судин. Для оцінки використовували альтернативну OS та ICRS шкали.

Використовуючи альтернативну OS шкалу, якість регенерату вважали поганою при отриманні сумарного балу – 0 та оптимальною при сумарно отриманому балі – 10.

Використовуючи альтернативну ICRS шкалу, оцінювали кожний показник індивідуально за чотирибальною системою. Отримані дані також свідчать про позитивний вплив застосування культури аутологічних МСК кісткового мозку на процеси хондрорепарації, причому якість за кожним показником була кращою в групі тварин, яким вводили культуру недиференційованих аутологічних МСК кісткового мозку.

Виразність дегенеративно-дистрофічного процесу в колінному суглобі оцінювали за шкалою гістоморфологічної оцінки Yoshioka та методичними рекомендаціями з експериментального дослідження та клінічного вивчення протиартрозних (хондромодельюючих) лікарських засобів, затверджених Фармкомітетом МОЗ України.

Результати. Внутрішньосуглобове введення культури недиференційованих аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку після травматичного ушкодження суглобового хряща при збереженні цілісності підхрящової кісткової пластинки в усіх тварин через 45 днів призводило до макроскопічного виповнення ділянки дефекту щільною гладкою блискучою хрящоподібною тканиною білого кольору. Суміжний хрящ був блискучого відтінку без візуальних ознак дегенерації. При мікроскопічному дослідженні в усіх тварин дефект суглобового хряща був повністю заповнений гіаліноподібною хрящовою тканиною. Поверхня регенерату була рівна, однорідна. Колагенові волокна матриксу регенерату нерівномірної щільності, але без певної орієнтації. Регенерат був представлений клітинами, які морфологічно наближаються до клітин гіалінового хряща. Зона кальцифікованого хряща та підхрящева кісткова тканина без особливостей, кістковий мозок – жировий. У ділянках непошкодженого материнського хряща в однієї тварини спостерігали відшарування частини тканини регенерату. Дегенеративні зміни в суміжному із зоною дефекту материнському хрящі були відсутні або мінімальні.

Таким чином, введення в колінний суглоб культури недиференційованих аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку після нанесення повношарового дефекту суглобового хряща при збереженій підхрящовій пластинці призводить до оптимізації процесів хондрорепарації з формуванням в ділянці дефекту гіаліноподібною хрящовою тканиною. Також хондропротекторний ефект проявлявся у вигляді різкого обмеження або відсутності дегенеративно-дистрофічних змін зі сторони суглобового хряща, який межує із зоною дефекту.

Внутрішньосуглобове введення культури аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку із спрямованим хондрогенним диференціюванням після травматичного ушкодження суглобового хряща при збереженні цілісності підхрящової кісткової пластинки в усіх тварин через 45 днів призводило до макроскопічного виповнення ділянки дефекту щільною гладкою блискучою хрящоподібною тканиною білого кольору. На відміну від тварин другої групи у цих

дослідах визначали явища гіперплазії, що проявлялося розповсюдженням суглобового хряща, що формується, за межі країв його дефекту. Суміжні ділянки суглобового хряща мали блискучий відтінок без візуальних ознак дегенерації.

При мікроскопічному дослідженні в усіх тварин дефект суглобового хряща був повністю заповнений гіаліноподібною хрящовою тканиною. Поверхня регенерату була хвиляста, однорідна, місцями поверхнева зона регенерату набувала ознак фіброзної тканини. Колагенові волокна матриксу регенерату, як і у тварин другої групи, були нерівномірної щільності та не мали певної орієнтації. Регенерат був представлений клітинами, які морфологічно наближались до клітин гіалінового хряща. В усіх тварин спостерігали гіперплазію регенерату, який розповсюджувався за межі дефекту. У ділянках неушкодженого материнського хряща у двох тварин спостерігали відшарування частини тканини регенерату. У ділянках неушкодженого хряща, який оточує зону дефекту, спостерігали початкові дегенеративні зміни у вигляді збільшення кластерів хондроцитів у порівнянні із тваринами другої групи. Кластери хондроцитів спостерігали в усіх зонах суглобового хряща.

Таким чином, введення в колінний суглоб культури аутологічних МСК кісткового мозку з попередньо спрямованим хондрогенним диференціюванням після нанесення повношарового дефекту суглобового хряща при збереженій підхрящовій пластинці призводить до формування у ділянці дефекту гіаліноподібною хрящовою тканиною, місцями із гіперпластичними ділянками. У суглобовому хрящі, який межує із зоною дефекту структурно-функціональна організація в основному зберігалась.

За альтернативною OS шкалою якість регенерату в контрольній групі склала $1,2 \pm 0,12$, при використанні культури недиференційованих аутологічних МСК кісткового мозку – $8,6 \pm 0,24$, а в групі із застосуванням культури аутологічних МСК кісткового мозку із попередньо спрямованим хондрогенним диференціюванням – $7,6 \pm 0,24$. Отримані дані свідчать про позитивний вплив застосування культури аутологічних МСК кісткового мозку на процеси хондрорепарації, причому якість регенерату була кращою в групі тварин, яким вводили культуру недиференційованих аутологічних МСК кісткового мозку ($t > 3$, $p < 0,01$).

У контрольних тварин сумарний показник оцінки розвитку дегенеративно-дистрофічного процесу в суглобовому хрящі стегнової кістки дорівнював $8,2 \pm 0,58$ балів.

У дослідних тварин другої та третьої серії прояви дегенеративно-дистрофічного процесу були значно меншими та були обмежені переважно зоною дефекту. Ці зміни відповідно дорівнювали $2,9 \pm 0,15$ та $5,15 \pm 0,30$.

Висновки. Отримані результати проведених експериментальних досліджень дозволяють нам говорити про можливість використання культури аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку для лікування хворих із травматичними дефектами суглобового хряща.